

# Evaluation of antioxidative and antimutagenic effects of quercetin in humans, in vitro and ex vivo

Citation for published version (APA):

Wilms, L. C. (2007). *Evaluation of antioxidative and antimutagenic effects of quercetin in humans, in vitro and ex vivo*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20071220lw>

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## DOI:

[10.26481/dis.20071220lw](https://doi.org/10.26481/dis.20071220lw)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

# Chapter 6

## Summary and general discussion

A healthy lifestyle is associated with decreased risk of cancer and of other degenerative diseases like cardiovascular diseases (CVD) and ageing. Epidemiology has rendered a fair amount of evidence that fruit and vegetables support a healthy lifestyle, and just may be the cause of preventing such diseases. Antioxidants as present in fruits and vegetables are suggested to play a role in the protection against degenerative diseases. However, recently epidemiological evidence for this has weakened, first, by the MRC/BHF where vitamin supplementation in over 20,000 high-risk individuals did not result in a decrease in mortality (Lancet, 2002. 360(9326): 23-33), and then even further by a recent meta-analysis of randomised controlled trials revealed that supplementation with vitamin A, E, or beta-carotene have resulted in an increased mortality (Bjelakovic, Jama, 2007. 297(8): p. 842-57).

In the studies described in this thesis, we hypothesised that not all human individuals respond equally to the suggested anticarcinogenic effects of fruits and vegetables, and that it is this underlying interindividual variability which masks epidemiological associations between fruit and vegetable intake and the incidence of cancer and CVD. More specifically, we hypothesised that if study populations were subdivided in certain groups differing in susceptibility, as genetically determined by polymorphisms in genes that play a pivotal role in carcinogenesis, protective effect by fruits and vegetables will become apparent. In order to test this hypothesis, a human intervention study was required.

For evaluating this hypothesis, we needed to identify a model anti-carcinogen. However, there seems to be no 'magic bullet', no single vitamin or specific antioxidant that appears to be able to claim sole responsibility for the protective effects by vegetables and fruits. From the many options, we chose to use quercetin as a model compound for the group of flavonoids, which are abundantly present in fruits and vegetables. Quercetin possesses good antioxidative properties, and has already been shown *in vitro* to be able to protect against DNA damage (Duthie, Mutat Res, 1997. 393(3): p. 223-31). We decided to dose quercetin through food e.g. through a specific fruit juice mixture; because in this juice, quercetin occurs in its natural form, bound to sugar moieties, through which we aimed to achieve high biological availability. In order to test our hypothesis, we aimed to discover whether certain subgroups within the study population are more susceptible to these DNA damage-preventing features of quercetine, based on their specific genotype. For this purpose, subjects were analysed for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the coding regions of 34 genes selected because of their known or suspected involvement in oxidative stress, biotransformation of quercetin and B[a]P, as well as DNA repair.

Chapter 2 focuses on the protective effect of quercetin on oxidative DNA damage *ex vivo* induced by two different reactive oxygen species involved in oxidative stress, superoxide anion radicals ( $O_2^{\bullet-}$ , PMS/NADH-mediated) and hydroxyl radicals ( $OH^{\bullet}$  (Fenton reaction, iron-induced)). Further, we tried to relate the difference in protective effect on oxidative DNA damage in human lymphocytes to quercetin's scavenging capacity of the two reactive oxygen species, i.e. we were trying to relate its

effectiveness as a scavenger to its effectiveness as a preventive measure against oxidative DNA damage. Human lymphocytes were chosen since they represent the only readily available source of DNA for assessing systemic effects in human intervention studies. Protection by quercetin against *ex vivo* induced oxidative DNA damage in the Comet assay has been compared with its direct scavenging capacity of quercetin measured by ESR spectroscopy. Quercetin appears capable of protecting human lymphocytes against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced DNA damage *in vitro* in a dose-dependent manner. However, the protection of lymphocytes against  $\text{O}_2^{\bullet-}$  is ambiguous. Low pre-incubation concentrations of quercetin ( $1\ \mu\text{M}$ ) tend to reduce the level of superoxide-induced oxidative DNA damage, while at  $100\ \mu\text{M}$  DNA damage is induced. The observed rate constant for the inhibition reaction of quercetin with  $\text{OH}^{\bullet}$  formation ( $3.2 \times 10^{12}\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ ) appears to be much higher as compared to the reaction with  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ( $1.1 \times 10^4\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ ). Hence we conclude that quercetin is very potent in protecting against oxidative DNA damage caused by hydroxyl radicals and is a more potent inhibitor of hydroxyl radical formation than a scavenger of superoxide radicals. Based on the clear effect of quercetin both as a direct scavenger of  $\text{OH}^{\bullet}$  measured by ESR as well as the protection against single strand breaks in lymphocytic DNA as measured by Comet assay, it was decided that  $\text{H}_2\text{O}_2$  is the preferred oxidative stressor for our test system.

To further optimise our study model, in Chapter 3 we started out to investigate the ability of quercetin to prevent DNA against induced damage in *in vitro* exposed human peripheral blood lymphocytes. First, we pre-incubated lymphocytes *in vitro* with a range of quercetin dosages, followed by a DNA-oxidizing challenge with hydrogen peroxide. The level of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative damage was determined by use of the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. Second, similarly quercetin-pretreated human lymphocytes were challenged by treatment with benzo(a)pyrene (B(a)P) which induces bulky DNA lesions, and this BPDE-DNA adduct formation was measured by  $^{32}\text{P}$ -postlabelling. Quercetin showed a clear and significant dose-dependent protection *in vitro* against both the formation of oxidative DNA damage ( $p < 0.01$ ) and of BPDE-DNA adducts ( $p < 0.05$ ). Since these studies demonstrated that quercetin pre-treatment of lymphocytes *in vitro* was very effective in significantly reducing the amount of induced DNA damage, in the third part of this Chapter we performed a pilot study *in vivo* where lymphocytes from eight female volunteers who consumed a quercetin-rich blueberry/apple juice mixture for four weeks, were treated *ex vivo* with an effective dose of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and benzo(a)pyrene, respectively, at three different time points, i.e. before ( $t = 0$  weeks), during ( $t = 2$  weeks) and after ( $t = 4$  weeks) the intervention. Results of the small scale *in vivo* study substantiated the idea of internally charging human lymphocytes by fruit antioxidants. Daily intake of blueberry juice during a four week period was capable of boosting the total antioxidant capacity of plasma, as reflected by the increase of the TEAC value from  $773\ \mu\text{M}$  trolox equivalent at  $t = 0$  to  $855\ \mu\text{M}$  at  $t = 4$  weeks ( $p = 0.04$ ) and by an increase in plasma quercetin content from  $5.0$  to  $10.6\ \text{nM}$  ( $p = 0.03$ ). After intervention, levels of oxidative damage upon *ex vivo* exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  were non-significantly ( $p = 0.07$ ) decreased by an average of 41%,

while the mean BPDE-DNA adduct level induced *ex vivo*, was non-significantly decreased by 11%. This combination of our findings *in vitro* and *ex vivo* provides evidence that quercetin is able to protect against chemically induced DNA damage in human lymphocytes, which may underlie its suggested anticarcinogenic properties. However, large inter-individual differences in prevention against *ex vivo* induced DNA damage were observed suggesting inter-individual differences in response to fruit antioxidants that may be explained by differences in genetic predisposition.

Our hypothesis that genetic polymorphisms could be at the basis of susceptibility of groups of people and might enable the prediction of the extent of an intervention effect was assessed in an adjusted *in vitro* model as described in Chapter 4. We started to challenge this hypothesis by investigating the impact of two quite common genetic polymorphisms and their effect on *in vitro* induced damage in human lymphocytes and the extent of protection by pre-treatment using an antioxidant. Two anti-oxidants, quercetin and ascorbic acid, were used at equimolar concentrations. Ascorbic acid was included in this test system as a positive control since it is a model dietary antioxidant. We aimed to establish the impact of genetic polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative DNA damage and on the effectiveness of quercetin and ascorbic acid in preventing this induced damage. *GSTM1* and *GSTT1* encode for enzymatic antioxidative defence. Lymphocytes of 12 healthy volunteers were pre-incubated either with 10 µM of quercetin or with 10 µM of ascorbic acid, and subsequently exposed to 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1h. Induction of oxidative DNA damage was quantified using the Comet assay. Overall, quercetin proves to have increased protective capability in human lymphocytes *in vitro* against oxidative DNA damage upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge when compared to ascorbic acid. Genotyping of these 12 subjects showed that 6 individuals were *GSTM1*+ (*homozygous wildtype and heterozygous*) and 6 were *GSTM1*- (*variant*); 8 were *GSTT1*+ (*homozygous wildtype and heterozygous*) and 4 *GSTT1*- (*variant*). Baseline levels of oxidative DNA damage did not differ between *GSTM1* or *GSTT1* variants and their respective wild types. Also with respect to *ex vivo* induced levels of oxidative DNA damage, no significant difference was observed between variants and wild types of both genotypes. Strikingly, the protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative DNA damage by quercetin was significantly higher in *GSTT1* wild types than in *GSTT1* variants (57% and 9% decrease, respectively; *p*=0.01). Furthermore, *GSTT1* wild types were protected against induced oxidative DNA damage by ascorbic acid pre-incubation while *GSTT1* variants showed an increase of damage (16% decrease versus 91% increase; *p*=0.01). For *GSTM1* variants and wild types, observed differences in protective effects of quercetin or ascorbic acid were not statistically significant. Overall, it is concluded that genetic polymorphisms appear to influence the protective effect against induced DNA damage of *in vitro* pre-treatment by quercetin and ascorbic acid; however, interpretation of results, although obtained in this relatively simple model, is complex.

The ultimate part of this thesis comprises the large-scale human dietary intervention study, which is described in Chapter 5. We designed this study to assess antioxidative and possible anti-genotoxic properties of fruit-borne antioxidants, to verify the hypothesis that individuals bearing polymorphisms in genes related to quercetin metabolism, B[a]P metabolism, defence against oxidative stress, and DNA repair, differ in their response to DNA protective effects of increased antioxidant intake. This was inspired by a study by Mooney et al. (Carcinogenesis, 1997. 18(3): p. 503-9) who found that DNA damage in smokers was affected by genetic polymorphisms and nutritional status: The association between smoking-adjusted plasma  $\beta$ -carotene levels and DNA damage appeared only significant in those subjects lacking the *GSTM1* detoxification gene. Further, Palli et al. (Carcinogenesis, 2004. 25(4): p. 577-84) concluded from data from the EPIC Italy study that *GSTM1* nulls, not *GSTM1* wildtypes showed strong inverse associations between DNA adduct levels and vegetable intake. In the present study 168 healthy volunteers consumed a blueberry/apple juice that provided 97 mg quercetin and 16 mg ascorbic acid per day. After a four-week intervention period, plasma concentrations of quercetin and ascorbic acid, and total plasma antioxidant capacity (TEAC) indeed were significantly increased. Overall, the approach to use a situation of elevated stress in order to more reliably monitor protection by quercetin proved to be very successful, since at baseline levels, there were hardly any effects measurable. We found 20% protection ( $p < 0.01$ ) against *ex vivo*  $H_2O_2$ -provoked oxidative DNA damage, as assessed by Comet assay. However, the averaged level of *ex vivo* induced BPDE-DNA adducts was increased by 28% upon intervention ( $P < 0.01$ ). Statistical analysis of 34 biologically relevant genetic polymorphisms revealed that 6 polymorphisms significantly influenced the outcome of the intervention. Lymphocytes of individuals bearing variant genotype for *Cyp1B1*\*5 seemed to benefit more than wildtypes from DNA-damage protecting effects upon intervention by blueberry/apple juice. Variants for *COMT* tended to benefit less, or even experienced detrimental effects from intervention. With respect to *GSTT1*, the effect is ambiguous: variants respond better in terms of intervention-related increase in TEAC, but wild types benefit more from its protecting effects against oxidative DNA damage.

Summarising results as described in this thesis, it is concluded that both *in vitro* pre-treatment as well as *in vivo* administration of quercetin result in protective effects in *ex vivo* oxidatively challenged human lymphocytes. We proved that a four-week dietary intervention, in which healthy volunteers consumed a quercetin-rich fruit juice, is capable of boosting antioxidative defence mechanism. With respect to oxidative stress, internal charging of lymphocytes by quercetin and probably other fruit-borne antioxidants appeared effective in preventing *ex vivo* induced DNA damage. These effects were even more pronounced in different subpopulations. For example, *GSTT1* variants showed the largest increase in plasma antioxidant capacity, whereas *GSTT1* wild types showed the largest decrease in single strand breaks. Interestingly, in the *in vitro* study described in Chapter 4, *GSTT1* wild types also showed the largest protection from *in vitro* quercetin pre-treatment. With respect to oxidative DNA damage, there

was a close match between *in vitro* experiments and the intervention study. As in *in vitro* experiments, the amount of *ex vivo* induced oxidative DNA damage was decreased upon intervention. Further, *GSTT1* wildtypes, that showed the largest decrease in *in vitro* induced oxidative DNA damage, also formed the group that benefited most from the intervention. However, when it comes to B[a]P treatment, the *in vitro* pre-treatment was very effective in reducing the amount of B[a]P-induced BPDE-DNA adducts. Unfortunately, upon intervention, the amount of B[a]P-induced BPDE-DNA adducts was increased instead of decreased. This means that care has to be taken in translating *in vitro* acquired information to the *in vivo* situation.

Grouping subjects according to their genetic polymorphism revealed interesting aspects. For instance, for a parameter like induced oxidative DNA damage, an average population-wide intervention-related decrease in damage was measured, whereas subjects carrying the *GSTT1* homozygous wild type showed a more pronounced beneficial effect of the intervention. Based on the finding that 6 polymorphisms significantly influenced the outcome of the intervention we conclude that genotyping of relevant polymorphisms enables selecting subgroups among the general population that benefit more of DNA damage-modulating effects of micronutrients. This implies that our proposed hypothesis was proven to be correct. This outcome may be taken into account in giving dietary recommendations on the intake of vitamins and antioxidants to the general public.

#### Implications for further research:

Epidemiological evidence for the role of fruits and vegetables in disease prevention is not unambiguous or entirely clear, nor is the underlying biological or biochemical mechanism. *In vitro* studies may be very helpful in discovering biochemical responses in human lymphocytes thereby providing crucial mechanistic insights. However, although rendering useful information, *in vitro* studies represent a model, which cannot take all biological factors of a human body into account. Since also human intervention studies cannot give all the answers, due to their complexity, *in vitro* and *in vivo* studies will have to remain to be synergistically performed in order to complement each other. However, through the research presented in this thesis, we showed that an alternative approach applying biomarkers for (anti-)carcinogenesis, and classifying different susceptible groups of people based on their genotype, may reveal patterns of prevention of disease that in previous epidemiological evaluations were possibly masked by inter-individual differences in susceptibility. It might be useful to re-evaluate some of the larger epidemiological trials by using this novel research approach. The present study should thus be seen as a starting point for further dedicated research, in which a stricter dietary intervention or an elaboration of the amount of stress posed on lymphocytes may help to further elucidate mechanisms within the black box that is called healthy lifestyle.

## Samenvatting en algemene discussie



Een gezonde levensstijl wordt in verband gebracht met een verlaagd risico op verschillende degeneratieve ziekten als kanker, hart- en vaatziekten en veroudering. De epidemiologie heeft door de jaren heen redelijk veel bewijs geleverd dat fruit en groenten bijdragen aan een gezonde levensstijl, en dat groenten en fruit een belangrijke rol kunnen spelen bij het voorkomen van dergelijke ziekten. Van antioxidanten die voorkomen in fruit en groenten wordt gedacht dat ze een rol spelen in de bescherming tegen degeneratieve ziekten. Onlangs is het epidemiologische bewijs hiervoor verminderd, in eerste instantie door de MRC/BHF studie waarin extra vitamine supplementen in meer dan 20.000 'high-risk' individuen niet leidden tot een verlaging van de sterfte (Lancet, 2002. 360(9326): 23-33). Het epidemiologische bewijs werd verder verzwakt door een recente meta-analyse van gerandomiseerd gecontroleerde experimenten die aantoonde dat aanvullende vitamine A, E of beta-caroteen inname zelfs leidden tot een verhoogde sterfte (Bjelakovic, Jama, 2007. 297(8): p. 842-57).

Bij de experimenten zoals beschreven in dit proefschrift, hebben we de hypothese gesteld dat niet alle mensen in dezelfde mate en op dezelfde manier reageren op de anticarcinogene effecten van fruit en groenten, en dat het juist deze verschillen zijn die mogelijk de epidemiologische verbanden tussen fruit en groente inname en het vóórkomen van kanker en hart- en vaatziekten maskeren. Preciezer gezegd hebben we verondersteld dat de beschermende werking van fruit en groenten duidelijker naar voren zal komen, wanneer studiepopulaties worden onderverdeeld in specifieke groepen, die verschillen in gevoeligheid op basis van onderscheid in genen.

Om deze hypothese te testen hebben we een interventie studie in mensen nodig en bovendien een model anti-carcinogeen. Helaas lijkt een wondermiddel niet te bestaan. Er is geen vitamine of specifieke antioxidant die als enige verantwoordelijk kan worden gehouden voor de beschermende werking van groenten en fruit. Uit de vele opties die voorhanden waren, hebben we ervoor gekozen om quercetine als modelstof te gebruiken voor de groep van flavonoïden die in grote mate voorkomen in groenten en fruit. Quercetine beschikt over goede antioxidatieve eigenschappen en het is al aangetoond in *in vitro* onderzoek dat het kan beschermen tegen DNA schade (Duthie, Mutat Res, 1997. 393(3): p. 223-31). We hebben ervoor gekozen om quercetine toe te dienen via een fruitdrink. In dit sap komt quercetine voor in zijn natuurlijke vorm, namelijk aan een suikergroep gebonden. Hierdoor is de quercetine beter biologisch beschikbaar. Ons doel was om specifieke subpopulaties te ontdekken in de onderzoekspopulatie die gevoeliger zijn voor de DNA beschermende werking van quercetine op basis van hun specifiek genotype. Proefpersonen werden getest op single nucleotide polymorphisms (SNPs) in het coderend deel van 34 genen, die geselecteerd zijn op basis van hun bekende of veronderstelde betrokkenheid bij oxidatieve stress, biotransformatie van quercetine en B[a]P en DNA herstel.

Hoofdstuk 2 richt zich op de beschermende rol van quercetine op oxidatieve DNA schade die *ex vivo* (buiten het lichaam) in lymfocyten veroorzaakt werd door twee reactieve zuurstof species die betrokken zijn bij oxidatieve stress. De ene zuurstof species zijn superoxide anion radicalen ( $O_2^{\bullet-}$ , PMS/NADH-gemedieerd) en de andere

zijn hydroxyl radicalen ( $\text{OH}^\bullet$  (Fenton reactie)). Verder hebben we geprobeerd om het verschil in beschermend effect op het niveau van oxidatieve DNA schade in lymfocyten in verband te brengen met de radicaal-vangend vermogen van quercetine voor beide zuurstof species. Dat wil zeggen, we hebben geprobeerd om de relatie tussen zijn effectiviteit als radicalenvanger en de effectiviteit als beschermer tegen oxidatieve DNA schade in kaart te brengen. Humane lymfocyten werden gekozen omdat ze de enige goed beschikbare bron voor DNA vormen waarmee systemische effecten in interventie studies met gezonde vrijwilligers onderzocht kunnen worden. We hebben bescherming door quercetine tegen *ex vivo* geïnduceerde oxidatieve DNA schade gemeten met de zogenaamde Comet assay. Vervolgens zijn deze resultaten vergeleken met het directe radicalenvangend vermogen van quercetine gemeten met ESR spectrometrie. Quercetine blijkt goed in staat om humane lymfocyten te beschermen tegen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -geïnduceerde DNA schade *in vitro* op een dosisafhankelijke manier. Daarentegen is de bescherming tegen schade geïnduceerd door  $\text{O}_2^{\bullet -}$  tweeledig. Relatief lage concentraties van quercetine lijken het schadeniveau te verlagen, terwijl hogere concentraties (100  $\mu\text{M}$ ) het niveau van oxidatieve DNA schade verhoogt. De reactiesnelheid van quercetine met  $\text{OH}^\bullet$  ( $3.2 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) blijkt veel hoger dan die van quercetine met  $\text{O}_2^{\bullet -}$  ( $1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Op basis hiervan concluderen we dat quercetine heel goed in staat is te beschermen tegen oxidatieve DNA schade veroorzaakt door hydroxyl radicalen. Verder kan geconcludeerd worden dat het sterker hydroxyl radicalen kan remmen, dan dat het superoxide radicalen kan wegvangen. Op basis van dit duidelijke effect van quercetine, is besloten dat  $\text{H}_2\text{O}_2$  de voorkeur heeft als oxidatieve stressor voor onze proefopzet.

Om ons onderzoeksmodel te optimaliseren, hebben we in Hoofdstuk 3 onderzocht of quercetine in staat was om het DNA te beschermen tegen geïnduceerde schade in *in vitro* blootgestelde humane lymfocyten. In het eerste deel zijn de lymfocyten behandeld met verschillende hoeveelheden quercetine, waarna er een hoeveelheid waterstofperoxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) aan werd toegevoegd dat het DNA beschadigt. Het schadeniveau dat veroorzaakt werd door de behandeling met  $\text{H}_2\text{O}_2$ , is gemeten met behulp van de Comet assay. In het tweede deel zijn op dezelfde manier met quercetine behandelde lymfocyten blootgesteld aan benzo(a)pyreen (B[a]P) dat aan het DNA bindt en zogenaamde 'bulky adducts' veroorzaakt. Deze BPDE-DNA adducten zijn gemeten met behulp van de  $^{32}\text{P}$ -postlabelling-techniek. Quercetine bleek duidelijk in staat om dosisafhankelijk het DNA te beschermen tegen zowel de oxidatieve DNA schade ( $p < 0.01$ ) als tegen de vorming van BPDE-DNA adducten ( $p < 0.05$ ). Aangezien quercetine *in vitro* goed in staat is om te beschermen tegen geïnduceerde DNA schade, hebben we in het derde deel van dit hoofdstuk een onderzoek opgezet waarbij 8 vrouwelijke vrijwilligers 4 weken lang een quercetine-rijke bosbessen/appelsap hebben gedronken. De lymfocyten van deze vrijwilligers zijn voor aanvang van de studie, na 2 weken, en na 4 weken blootgesteld aan dezelfde schadelijke stoffen als in de eerdere delen, respectievelijk  $\text{H}_2\text{O}_2$  en B(a)P. De uitkomst van deze kleinschalige studie ondersteunde het idee dat lymfocyten in het lichaam konden worden

opgeladen met antioxidanten uit fruit. De dagelijkse inname van het bosbessen/appelsap gedurende vier weken was voldoende om de antioxidant-capaciteit van het plasma te verhogen. Het DNA-schadeniveau veroorzaakt door zowel  $H_2O_2$  als B(a)P blootstelling was (niet significant) verlaagd na de interventie. De combinatie van deze gegevens leverde het bewijs dat quercetine in staat is om witte bloedcellen te beschermen tegen chemisch geïnduceerde DNA-schade. In deze groep vrijwilligers waren grote verschillen te zien in de bescherming tegen geïnduceerde DNA-schade. Deze kunnen mogelijk verklaard worden door verschillen in genetische gevoeligheid, bepaald door genetische polymorfismen.

De hypothese dat genetische polymorfismen de gevoeligheid van groepen mensen bepalen, en dat zo het effect van een interventie voorspeld kan worden, hebben we getest in een *in vitro* model dat beschreven wordt in Hoofdstuk 4. Om deze hypothese te testen hebben we de invloed van twee veel voorkomende genetische polymorfismen op de *in vitro* geïnduceerde schade in lymfocyten getest, en hun effect op bescherming door een antioxidant tegen deze schade bekeken. Twee verschillende antioxidanten, quercetine en vitamine C, zijn gebruikt in dezelfde concentratie. Vitamine C is meegenomen als model-antioxidant die voorkomt in voeding. Het doel was om de invloed van genetische polymorfismen in *GSTM1* and *GSTT1* op zowel  $H_2O_2$ -geïnduceerde oxidatieve DNA schade als op de effectiviteit van quercetine en vitamine C in het beschermen van deze schade te onderzoeken. De keuze voor *GSTM1* en *GSTT1* is gemaakt omdat beide coderen voor enzymatische antioxidatieve afweer. Lymfocyten van 12 gezonde vrijwilligers werden behandeld met ofwel quercetine ofwel vitamine C, en vervolgens blootgesteld aan  $H_2O_2$ . De hoeveelheid oxidatieve DNA schade werd wederom gekwantificeerd met behulp van de Comet assay. Het blijkt dat quercetine in dit model in humane lymfocyten een hogere mate van bescherming biedt dan vitamine C. Uit genotyperings-analyse van deze 12 vrijwilligers bleek dat 6 van hen *GSTM1*+ (*homozygoot wildtype en heterozygoot*) en 6 *GSTM1*- (*variant*) waren; verder bleken 8 individuen *GSTT1*+ (*homozygoot wildtype en heterozygoot*) en 4 *GSTT1*- (*variant*). De achtergrond niveaus van oxidatieve DNA schade verschilden niet tussen de verschillende groepen. Evenmin waren er verschillen in *ex vivo* geïnduceerde niveaus van oxidatieve DNA schade. Opvallend genoeg was de bescherming tegen  $H_2O_2$ -geïnduceerde oxidatieve DNA schade door quercetine significant hoger in *GSTT1* wild types dan in de *GSTT1* varianten (57% and 9% afname, respectievelijk;  $p=0.01$ ). Daarnaast bleken *GSTT1* wild types beschermd door een pre-incubatie met vitamine C tegen geïnduceerde oxidatieve DNA schade terwijl *GSTT1* varianten juist een verhoging van de schade lieten zien (16% afname versus 91% toename;  $p=0.01$ ). Voor wat betreft *GSTM1* varianten en wild types, waren de geobserveerde verschillen in beschermend effect van quercetine of vitamine C niet statistisch significant. In het algemeen kunnen we concluderen dat genetische polymorfismen het beschermend effect tegen geïnduceerde DNA schade door een *in vitro* pre-incubatie met quercetine of vitamine C lijken te beïnvloeden. De interpretatie van de resultaten, hoewel verkregen met een relatief eenvoudige studie opzet, is gecompliceerd.

Het laatste deel van dit proefschrift omvat de grootschalige voedingsinterventie studie in gezonde vrijwilligers, die beschreven staat in Hoofdstuk 5. Deze studie hebben we zo opgezet om de anti-oxidatieve en mogelijk anti-genotoxische eigenschappen van antioxidanten uit fruit te onderzoeken en om de hypothese te testen dat individuen met polymorfismen in genen die betrokken zijn bij quercetine metabolisme, B[a]P omzetting, afweer tegen oxidatieve stress en DNA herstel, verschillen in hun respons ten aanzien van DNA beschermende effecten van verhoogde antioxidant inname. Dit onderzoek was geïnspireerd op een studie door Mooney et al. (Carcinogenesis, 1997. 18(3): p. 503-9) die aantoonde dat DNA schade in rokers beïnvloed werd door genetische polymorfismen en voedingsstatus. Het verband tussen roken en voor roken gecorrigeerde  $\beta$ -caroteen concentraties in plasma en DNA schade bleek alleen significant in proefpersonen zonder het *GSTM1* detoxificatie gen. Verder heeft Palli et al. (Carcinogenesis, 2004. 25(4): p. 577-84) aangetoond met gegevens uit de EPIC Italy study dat alleen *GSTM1* varianten, en niet de *GSTM1* wild types een sterk omgekeerd verband lieten zien tussen DNA adduct niveaus en de inname van groenten. In de huidige studie hebben 168 gezonde vrijwilligers een bosbessen/appelsap gedronken die voorziet in 97 mg quercetin en 16 mg vitamine C per dag. Na een vierweekse interventie periode waren zowel de plasma concentraties van quercetine en vitamine C als de totale antioxidant capaciteit van het plasma (TEAC) verhoogd. De aanpak om een toestand van verhoogde stress om betrouwbaarder de bescherming door quercetine te kunnen bepalen bleek erg succesvol, aangezien er in achtergrondniveaus nauwelijks effecten meetbaar waren. In deze studie hebben we een 20% bescherming ( $p < 0.01$ ) tegen *ex vivo*  $H_2O_2$ -veroorzaakte oxidatieve DNA schade, getest met de Comet assay. Daarentegen was het gemiddelde niveau van *ex vivo* veroorzaakte BPDE-DNA adducten verhoogd met 28% na interventie ( $P < 0.01$ ). Statistische analyse van 34 biologisch relevante genetische polymorfismen heeft aangetoond dat 6 ervan significant de uitkomst van de interventie beïnvloedden. Lymfocyten van individuen met het variant genotype voor *Cyp1B1*\*5 lijken meer baat te hebben bij bescherming tegen DNA-schade door de bosbessen/appelsap interventie dan individuen met het wild type. Varianten voor *COMT* lijken juist minder baat te hebben, of zelfs schadelijke effecten te ondervinden van de interventie. Wat *GSTT1* betreft is het effect dubbel: varianten hebben een betere respons als gekeken wordt naar de toename in TEAC door de interventie, maar wild types hebben meer baat bij de beschermende effecten tegen oxidatieve DNA schade.

Als we de resultaten zoals beschreven in dit proefschrift samenvatten, kunnen we concluderen dat zowel *in vitro* pre-incubatie als *in vivo* toediening van quercetine resulteert in beschermende effecten in *ex vivo* aan oxidatieve stress blootgestelde humane lymfocyten. We hebben bewezen dat een vierweekse voedingsinterventie, waarin gezonde vrijwilligers een quercetine-rijke fruitdrank drinken, in staat is om de anti-oxidatieve afweer te verhogen. Met betrekking tot oxidatieve stress bleek het in het lichaam opladen van lymfocyten met quercetine en andere antioxidanten uit fruit effectief in het voorkomen van *ex vivo* geïnduceerde DNA schade. Deze effecten waren

zelfs meer uitgesproken in verschillende subpopulaties. Bijvoorbeeld *GSTT1* varianten lieten de grootste toename in plasma antioxidant capaciteit zien, terwijl *GSTT1* wild types de grootste afname in enkelstrengs DNA breuken. In de *in vitro* studie beschreven in Hoofdstuk 4, lieten *GSTT1* wild types ook de grootste bescherming zien als gevolg van de *in vitro* quercetine pre-incubatie. Met betrekking tot oxidatieve DNA schade was er een grote overeenkomst tussen de *in vitro* experimenten en de interventie studie. Net als in *in vitro* experimenten was de hoeveelheid van *ex vivo* geïnduceerde oxidatieve DNA schade verlaagd na interventie. Bovendien bleek dat *GSTT1* wild types, die de grootste afname in *in vitro* geïnduceerde oxidatieve DNA schade lieten zien, ook de groep vormden die de meeste baat had bij de interventie. Bij blootstelling aan B[a]P bleek de *in vitro* voorbehandeling met quercetine erg effectief in het verminderen van de hoeveelheid B[a]P-geïnduceerde BPDE-DNA adducten. Helaas bleek na interventie de hoeveelheid B[a]P geïnduceerde BPDE-DNA adducten verhoogd in plaats van verlaagd. Dit houdt in dat men in het geval van B[a]P voorzichtig moet zijn met het vertalen van *in vitro* verworven informatie naar de *in vivo* situatie.

Het ondervinden van proefpersonen naar hun genetisch polymorfisme heeft interessante aspecten opgeleverd. Bijvoorbeeld, voor een parameter als geïnduceerde oxidatieve DNA schade werd in de gemiddelde populatie een interventie-gerelateerde afname in schade gemeten, terwijl individuen met het *GSTT1* homozygoot wild type nog een meer uitgesproken beschermend effect van de interventie lieten zien. Gebaseerd op de bevinding dat 6 polymorfismen de uitkomst van de interventie significant beïnvloeden, kunnen we concluderen dat genotypering van relevante polymorfismen het mogelijk maakt om subgroepen in de algemene bevolking te selecteren die meer baat hebben bij DNA-schade modulerende effecten van micronutriënten. Dit houdt in dat onze voorgestelde hypothese correct is. Met deze uitkomst kan rekening worden gehouden bij het geven van voedingsadviezen aan de algemene bevolking voor wat betreft de inname van vitaminen en antioxidanten.

#### Implicaties voor verder onderzoek:

Epidemiologisch bewijs voor de rol van groenten en fruit in de preventie van ziekten is in zekere mate dubbelzinnig of niet helemaal duidelijk, bovendien is het onderliggend biologisch of biochemisch mechanisme vaak onduidelijk. *In vitro* onderzoeken kunnen helpen in het ontdekken van biochemische reacties in humane lymfocyten en zo leiden tot cruciale mechanistische inzichten. Hoewel ze nuttige informatie leveren, blijven *in vitro* studies een modelsituatie, waarin niet alle biologische factoren van een menselijk lichaam kunnen worden meegenomen. Aangezien ook humane interventiestudies door hun complexiteit niet alle antwoorden kunnen geven, zullen *in vitro* studies en *in vivo* studies beide moeten worden uitgevoerd, zodat ze elkaar aanvullen. Met het onderzoek dat gepresenteerd werd in dit proefschrift, hebben we laten zien dat een alternatieve aanpak waarin biomarkers voor (anti)carcinogenese en het classificeren van verschillende gevoelige groepen van proefpersonen op basis van hun genotype worden toegepast, patronen kan laten zien in de bescherming tegen ziekte, die in

eerdere epidemiologische studies wellicht gemaskeerd werden door interindividuele verschillen in gevoeligheid. Het zou nuttig kunnen zijn om enkele grotere epidemiologische studies opnieuw te bestuderen met behulp van deze nieuwe onderzoeksanpak. De huidige studie moet daarom gezien worden als een uitgangspunt voor verder gericht onderzoek, waarin een striktere voedingsinterventie of een uitbreiding van de hoeveelheid stress die aan de lymfocyten wordt toegediend kan helpen om mechanismen in de 'black box' die gezonde levensstijl heet, verder te verhelderen.